

## ISOLASI DNA TANAMAN JERUK DENGAN MENGGUNAKAN METODE CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*)

Nova Triani

Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur

Email : [novatriani.agrotek@upnjatim.ac.id](mailto:novatriani.agrotek@upnjatim.ac.id)

### ABSTRAK

Tanaman jeruk termasuk tanaman buah terpenting di dunia. Buah jeruk menjadi peringkat pertama dalam pasar buah internasional. Indonesia termasuk negara pengimpor jeruk terbesar kedua di ASEAN. Jeruk merupakan salah satu komoditas hortikultura yang berfungsi sebagai sumber gizi, sumber pendapatan, dan sumber devisa negara. Kompetisi global peningkatan penjualan jeruk dan ketahanan industri jeruk bergantung pada ketersediaan kultivar yang baik secara genetik. Pemuliaan tanaman jeruk dapat dilakukan dengan cara persilangan dan teknik hibridisasi somatik. Identifikasi tanaman hasil pemuliaan tanaman jeruk dapat dilakukan berdasarkan karakter morfologi, anatomi, sitogenetika dan molekuler. Analisis secara molekuler lebih akurat karena dilakukan pada level DNA. Hal pertama yang dilakukan untuk identifikasi tanaman jeruk secara molekuler ialah isolasi DNA. Isolasi DNA tanaman jeruk dapat dilakukan dengan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Setelah DNA diperoleh, maka DNA diuji secara kuantitas dan kualitas untuk mengetahui tingkat konsentrasi dan kemurnian. Metode CTAB dapat digunakan untuk mengisolasi DNA tanaman jeruk.

**Kata kunci:** kemurnian, konsentrasi, uji kuantitas, uji kualitas

### ABSTRACT

*Citrus is a important fruit in the world. It became the first in international fruits market. Indonesia is among the second largest citrus importing countries in ASEAN. Citrus is a one of the horticultural comodities that serves as a source of nutrition, a source of income, and a source of foreign exchange. Global competition for increased sales of citrus and the resilience of the citrus industry depend on availability of genetically good cultivars. Citrus plant breeding can be done by crossing and somatic hybridization techniques. Identification of citrus plant breeding results can be done based on morphological, anatomical, cytogenetic and molecular characters. Molecular analysis is more accurate because it is done at the DNA level. The first thing to do to identify the citrus plant molecularly is DNA isolation. Isolation of the citrus plants DNA can be done using CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) method. After DNA is obtained, DNA is tested in quantity and quality to find out the level of concentration and purity. Methode of CTAB can be used for isolating citrus DNA.*

**Keywords:** *purity, concentration, quantity testing, quality testing*

### PENDAHULUAN

Jeruk ialah tanaman buah komersial terpenting di dunia, dan dapat tumbuh pada wilayah subtropis maupun tropis. Buah jeruk menjadi peringkat pertama dalam pasar buah internasional (Food and Agriculture Organization of the United Nations Annual Statistics, 2003 dalam Chen *et al.*, 2007). Jeruk juga dapat dikonsumsi sebagai jus selain sebagai buah segar, minyak esensial dan pectin (Kunitake *et al.*, 2002). Jeruk merupakan salah satu komoditas hortikultura yang berfungsi sebagai sumber gizi, sumber

pendapatan, dan sumber devisa negara. Besarnya kontribusi agroindustri jeruk dalam meningkatkan pendapatan akan menumbuhkan sentra pengembangan jeruk baru (Karsinah *et al.* 2002).

Pengembangan varietas jeruk baru mengarah pada varietas adaptif lingkungan serta disukai konsumen dari segi rasa. Identifikasi hasil pemuliaan tanaman jeruk dapat dilakukan secara morfologi, anatomi, sitogenetika dan molekuler. Salah satu tahapan metode yang dilakukan untuk identifikasi molekuler yaitu teknik isolasi DNA.

DNA pada tumbuhan terdapat di dalam inti sel dan beberapa organ lain di dalam sel seperti mitokondria dan kloroplas. DNA genom inti berasal dari inti sel, DNA genom mitokondria berasal dari mitokondria, DNA genom kloroplas berasal dari kloroplas. Prinsip isolasi DNA ialah memisahkan DNA genom dari komponen-komponen sel lain. Membran sel dilisis dengan menambahkan detergen untuk membebaskan isinya, kemudian pada ekstrak sel tersebut ditambahkan protease (yang berfungsi mendegradasi protein) dan RNase (yang berfungsi untuk mendegradasi RNA), sehingga yang tinggal adalah DNA. Larutan DNA di presipitasi dengan etanol dan bisa dilarutkan lagi dengan air.

Isolasi DNA dapat menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Setelah DNA diperoleh maka dilakukan uji kualitas dan kuantitas DNA tersebut. Tujuan dari penelitian ini ialah mengetahui isolasi DNA tanaman jeruk dengan menggunakan metode CTAB.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2010 di Laboratorium Pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO) Tlekung Kecamatan Junrejo Kota Batu.

Alat yang digunakan ialah mortar, pestel, gelas ukur, erlenmeyer, *timer*, *beaker glass*, *stirrer*, mikropipet, timbangan analitik, vortex, tube, mesin spektrofotometer, *autoclave*, *waterbath*, mesin *centrifuge*, mesin elektroforesis dan alat visualisasi Biodoc Analyze.

Bahan yang digunakan ialah daun 23 tanaman jeruk hasil fusi protoplas (G0) antara jeruk Siam Madu dengan Satsuma Mandarin dan juga kedua parentalnya, aquades, alkohol 70%, Nitrogen cair, mercaptoethanol, pvp (polyvinyl pyrrolidone 10), buffer ekstraksi, ammonium asetat, CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), Chloroform: Isoamylalcohol (24:1) (CHISAM), ethanol dingin, isopropanol dingin, buffer TE, buffer pencuci, RNase (Roche), ethanol 96% dingin, Agarose SPI (Duchefa Biochemie), Agarose Molecular Screening (Roche), Agarose High Resolution (Sigma), buffer TBE, Aqua bidestilata steril (Ikapharmindo), DNA ladder 100 bp (Promega), Ethidium Bromide (EtBr), loading dye (Fermentas; Promega).

### Pengambilan sampel

Sampel daun berasal dari daun 23 tanaman jeruk hasil fusi protoplas (G0) antara

jeruk Siam Madu dengan Satsuma Mandarin yang berumur  $\pm 2$  tahun dan juga kedua parentalnya. Daun diambil dan disterilisasi dengan alkohol 70% lalu ditimbang tanpa tulang daunnya sebanyak 0,5 gram.

### Isolasi DNA

Penggunaan DNA volume kecil didapatkan dengan menggunakan metode CTAB (Karsinah *et al.*, 2002). Buffer ekstraksi sebanyak 1 ml (60 ml CTAB 3%; 47,6 ml NaCl 1,4 M; 8 ml EDTA 20 mM dan 20 ml Tris-HCl 100 mM) dan mercaptoethanol 5  $\mu$ l dipanaskan dalam *waterbath* 65°C selama 15 menit. Sampel daun sebanyak 0,5 gram, pvp, dan nitrogen cair digerus di dalam mortar hingga menjadi serbuk. Kemudian dimasukkan dalam tube yang telah berisi buffer ekstraksi lalu dikocok. Kemudian dihomogenisasi dengan menggunakan vortex dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 30 menit. Setiap 5 menit tube digoyang atau dibolak-balik (*inverting*). Selanjutnya ditambahkan 700  $\mu$ l Chloroform:Isoamylalcohol (CHISAM) (24:1) lalu dihomogenisasi dengan menggunakan vortex. Lalu dipisahkan dengan menggunakan mesin sentrifuge berkecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Kemudian supernatant (bagian atas) diambil dan dimasukkan ke dalam tube baru. Lalu ditambahkan 1 ml CHISAM dan dipisahkan dengan menggunakan mesin sentrifuge berkecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Kemudian diambil fase atasnya lalu ditambah dengan 1 ml Isopropanol dingin kemudian diaduk secara perlahan (*gently*). Selanjutnya diinkubasi di dalam *freezer* selama 30 menit, lalu dipisahkan dengan menggunakan mesin sentrifuge berkecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Kemudian supernatant dibuang lalu dibersihkan 2 kali dengan 200  $\mu$ l buffer pencuci. Setelah itu, endapan DNA (pellet) dikeringanginkan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Lalu ditambahkan 500  $\mu$ l buffer TE dan 1  $\mu$ l RNase. Lalu diinkubasi di dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 30 menit. Didinginkan sebentar lalu ditambahkan 1 ml ethanol absolute 96% dingin dan diinkubasi di dalam *freezer* selama 30 menit. Kemudian dipisahkan dengan menggunakan mesin sentrifuge berkecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatant (bagian atas) dibuang dan bagian pellet (DNA) dikeringanginkan di dalam LAF. Kemudian pellet DNA disuspensi dengan 50  $\mu$ l buffer TE dan disimpan pada suhu -4°C hingga digunakan.

### Pengukuran kualitas dan kuantitas DNA

Setelah sampel DNA diperoleh, selanjutnya untuk mengetahui kualitas DNA dilakukan elektroforesis dengan menggunakan 1% agarose SPI (Duchefa Biochemie), yang dilarutkan di dalam TBE 0,5x. Langkah-langkah elektroforesis yang dilakukan sebagai berikut:

- a. Agarose 1% dipanaskan, kemudian didiamkan sampai hangat-hangat kuku dan ditambahkan Ethidium Bromide (EtBr) 1/10.000 volume lalu dituang ke dalam plate sampai menjadi keras.
- b. Gel direndam ke dalam *elektroforesis chamber*. Sampel yang digunakan sebanyak 5  $\mu$ l DNA dan 2  $\mu$ l *loading dye* yang kemudian dimasukkan ke dalam sumur (*wells*).
- c. Elektroforesis pada tegangan 50 volt selama 1 jam
- d. Visualisasi hasil elektroforesis di atas lampu ultraviolet dengan menggunakan alat Biodoc Analyze.

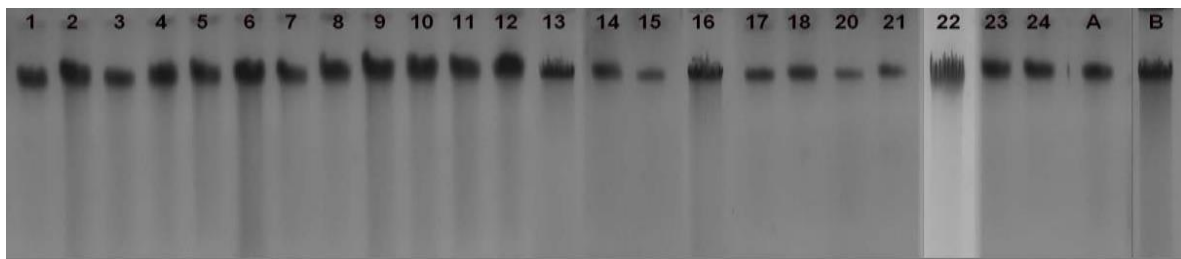
Nilai konsentrasi DNA diketahui dengan cara dilakukan pengukuran dengan menggunakan alat spektrofotometer. Sampel DNA diukur pada absorbansi 260 nm dan 280 nm. Sedangkan kemurnian DNA dihitung berdasarkan hasil bagi nilai  $ABS_{260}$  dengan  $ABS_{280}$  ( $OD_{260}/OD_{280}$ ). Hasil pembagian ditunjukkan dengan nilai rasio, dimana nilai rasio 1,8 nm menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang sangat baik. Apabila terkontaminasi dengan protein, nilai rasio yang diberikan lebih kecil dari nilai rasio konsentrasi DNA murni dan apabila terkontaminasi oleh RNA, nilai rasio yang diberikan lebih besar dari 2 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

**Tabel 1. Hasil Uji Kuantitas DNA Tanaman Hasil Fusi Protoplas (G0) dan Kedua Parentalnya dengan Spektrofotometer**

Kode	Nama Tanaman	Panjang Gelombang $A_{260}$	Panjang Gelombang $A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$ (kemurnian) atau Rasio absorbansi (R)	Konsentrasi DNA (ng/ $\mu$ l)
A	Siam madu	0,147	0,073	2,018	147
B	Satsuma mandarin	0,725	0,38	1,906	725
1	1 FS 29	0,199	0,119	1,674	199
2	22 FS 33	1,374	0,813	1,691	1.374
3	4 FS 4	1,49	0,858	1,736	1.490
4	10 FS 17	0,313	0,203	1,54	313
5	14 FS 29	1,628	0,948	1,716	1.628
6	3 FS 19	0,717	0,368	1,947	717
7	7 FS 8	0,197	0,127	1,551	197
8	24 FS 31	0,722	0,427	1,692	722
9	6 FS 23	0,332	0,202	1,642	332
10	16 FS 13	1,145	0,651	1,759	1.145
11	15 FS 12	0,77	0,451	1,707	770
12	11 FS 6	1,217	0,723	1,683	1.217
13	19 FS 14	0,199	0,1	1,991	199
14	21 FS	0,73	0,446	1,638	730
15	18 FS	1,472	0,773	1,904	1.472
16	23 FS 25	0,459	0,240	1,910	459
17	2 FS 21	0,846	0,449	1,883	846
18	20 FS 18	0,101	0,07	1,442	101
20	5 FS 3	0,82	0,417	1,965	820
21	12 FS 29	0,481	0,264	1,824	481
22	9 FS 3	0,619	0,324	1,911	619
23	17 FS 15	0,541	0,359	1,506	541
24	8 FS 22	0,098	0,067	1,454	98

Tanaman hasil fusi protoplas (1-24) antara Siam Madu (A) dengan Satsuma Mandarin (B) dan tanaman parentalnya



**Gambar 1.** Hasil Uji Kualitas DNA dengan Elektroforesis 1% Agarose. 1-24 = sampel dari tanaman hasil fusi protoplas; A = parental; B = parental

Sebelum isolasi DNA dilakukan, sampel daun disterilisasi terlebih dahulu dengan diusap menggunakan alkohol 70%. Tujuannya untuk menghilangkan kontaminan debu dan mikroorganisme yang menempel pada sampel daun. Sebelum dilakukan penggerusan sampel daun dengan nitrogen cair hingga menjadi serbuk, tulang daun dibuang agar sampel daun yang digerus lebih mudah hancur. Selanjutnya pencampuran dengan buffer ekstraksi. CTAB merupakan sejenis deterjen yang dapat mendegradasi dinding sel, denaturasi protein, memisahkan karbohidrat (Kaidah dan Suprpto, 2003), merusak membran sel dan melarutkan DNA (Purwantara, 2001). Apabila dinding sel terdegradasi maka semua isi sel dapat keluar termasuk DNA dan dilepaskan ke dalam buffer ekstraksi. Dalam proses isolasi DNA tanaman, penambahan senyawa pereduksi seperti mercaptoetanol dapat mencegah proses oksidasi senyawa fenolik sehingga menghambat aktivitas radikal bebas yang dihasilkan oleh oksidasi fenol terhadap asam nukleat (Wilkins dan Smart, 1996). Mercaptoetanol juga berfungsi untuk melindungi RNA dari senyawa quinon, disulphide, peroksida, poliphenoksidase, dan protein (Milligan, 1992). Homogenisasi dengan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi dengan waterbath yang bertujuan untuk pemanasan. Proses pemanasan pertama bertujuan untuk melarutkan CTAB dan merchaptoetanol. Sedangkan pemanasan yang kedua bertujuan untuk mendegradasi protein dan dinding sel. Pemisahan dilakukan menggunakan mesin centrifuge. Fungsi sentrifugasi dengan mesin centrifuge bertujuan untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya. Molekul yang mempunyai berat molekul besar akan berada di bagian bawah tabung dan molekul ringan akan

berada pada bagian atas tabung (Mader, 1993). Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah, yaitu supernatan pada bagian atas dan pelet pada bagian bawah (Campbell, 2002). Isolasi DNA menggunakan teknik sentrifugasi. Penambahan CHISAM (chloroform isoamylalcohol) berfungsi untuk mengekstrak dan mengendapkan komponen polisakarida di dalam buffer ekstraksi yang mengkontaminasi larutan DNA (Ningrum, 2008). Penambahan buffer pencuci (*washing buffer*) bertujuan untuk mencuci DNA dari pengotor (Utami *et al.*, 2013). Pemberian isopropanol dan etanol dilakukan agar terjadi dehidrasi DNA sehingga terjadi presipitasi (Purwantara, 2001). Supernatant (bagian atas) dibuang dan bagian pellet (DNA) dikeringanginkan di dalam LAF. Hal ini bertujuan untuk mengeringkan pellet dari sisa-sisa buffer maupun etanol. Terakhir, bagian pellet yaitu DNA yang berhasil diisolasi, disuspensi dengan 50  $\mu$ l buffer TE dan disimpan pada suhu  $-4^{\circ}\text{C}$  hingga digunakan. Tahapan terakhir penambahan buffer TE berfungsi untuk melarutkan DNA yang dihasilkan dan menjaga DNA agar tidak mudah rusak. Dalam buffer TE mengandung EDTA yang berfungsi sebagai senyawa pengkelat yang mengikat ion Magnesium, yaitu kofaktor yang diperlukan untuk aktivitas berbagai enzim nuklease (Sudarsono, 1996).

Setelah DNA berhasil diisolasi, langkah selanjutnya yaitu pengukuran kualitas dan kuantitas DNA. Pengukuran kualitas DNA dilakukan dengan elektroforesis. Elektroforesis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya (Utami *et al.*, 2013) Hasil elektroforesis dilihat secara visual dengan menggunakan alat Biodoc Analyze/Chemi Doc/Gel Doc. DNA berkualitas baik apabila hasil elektroforesis menunjukkan

pita DNA yang jelas. Fungsi Ethidium Bromide (EtBr) adalah sebagai pewarna DNA pada gel elektroforesis (Artati, 2013).

Metode ekstraksi DNA dengan CTAB akan menghasilkan pita DNA yang berukuran tebal dan dapat memisahkan DNA dari polisakarida karena adanya perbedaan karakteristik kelarutan. Metode ini tidak membutuhkan biaya yang lebih mahal dibandingkan dengan menggunakan kit. Selain itu, kelebihan dari ekstraksi ini adalah pita DNA yang diperoleh lebih tebal bila dibandingkan dengan ekstraksi metode fenol dan tanpa fenol.

Spektrofotometer digunakan untuk pengukuran nilai konsentrasi DNA. Sampel DNA diukur pada absorbansi 260 nm dan 280 nm. Kemurnian (*purifikasi*) DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dalam larutan, molekul DNA yang telah terukur dapat diketahui mencapai nilai standar yang berkisar antara 1,8-2,0 nm. Jika nilai tersebut lebih kecil dari 1,8 nm maka dapat terindikasi mengalami kontaminasi protein, alkohol, atau fenol di dalam larutan. Apabila terjadi kesulitan dalam menemukan dan mengukur kemurnian serta konsentrasi DNA, hal ini disebabkan DNA yang berada dalam tube menyebar atau berada hanya pada satu titik saja (Nayasilana *et al.*, 2010).

Kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorbansi DNA ( $A_{260}/A_{280}$ ). Nilai rata-rata kemurnian (R) DNA yang diperoleh dari hasil penelitian ini berkisar antara 1,4-2,0. Sambrook *et al.* (1989) menyatakan bahwa hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio  $A_{260}/A_{280}$  antara 1,8 hingga 2,0. Pada penelitian ini sampel-sampel yang memiliki kemurnian diantara 1,8-2,0 adalah sampel nomor A, B, 6, 13, 15, 16, 17, 20, 21 dan 22, sedangkan sampel lainnya memiliki kemurnian dibawah 1,8 atau lebih kecil dari 1,8 yang menandakan adanya kontaminan berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Pada penelitian ini tidak ada sampel yang memiliki kemurnian lebih dari 2,0. Jika nilai rasio  $A_{260}/A_{280}$  lebih dari 2,0 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya (Sambrook dan Russell, 2001).

Pada penelitian ini nilai konsentrasi DNA yang diperoleh berkisar antara 98-1.628 ng/ $\mu$ l, nilai ini tergolong tinggi. Tinggi atau rendahnya konsentrasi DNA yang dihasilkan dalam proses isolasi dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu faktor suhu inkubasi dan lama waktu inkubasi. Kombinasi pengaturan suhu dan lama inkubasi yang tepat dapat menghasilkan konsentrasi DNA sesuai dengan yang diharapkan.

Sampel yang telah dicampur dengan larutan *lysis buffer* diinkubasi pada suhu tertentu. Larutan *lysis buffer* berfungsi untuk menghancurkan jaringan dan membran sel, mengeliminasi kontaminan, sehingga yang didapatkan pada tahap ini ialah DNA genom. Jika suhu inkubasi yang digunakan terlalu tinggi maka dapat merusak DNA, sedangkan jika suhu terlalu rendah maka membran serta jaringan sel tidak dapat hancur. Larutan *lysis buffer* bekerja dengan optimal pada suhu yang tidak terlalu rendah.

Lama waktu inkubasi juga berpengaruh terhadap tinggi atau rendahnya konsentrasi DNA. Jika terlalu lama diinkubasi maka dapat merusak DNA dan jika terlalu sebentar tidak dapat menghancurkan membran dan jaringan sel. Oleh karena itu, suhu dan waktu harus diatur dengan baik agar didapatkan DNA dengan konsentrasi sesuai.

Konsentrasi maupun kemurnian DNA yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh faktor teknis selama pengerjaan isolasi DNA, diantaranya yaitu faktor pemindahan supernatan yang mengandung DNA setelah diinkubasi ke dalam tube baru dan pengeringan isolat. Pemindahan harus dilakukan dengan teliti supaya jaringan-jaringan yang telah hancur dan berada di bagian bawah tube tidak ikut terambil, sedangkan pengeringan pelet DNA pada akhir isolasi harus kering dari larutan purifikasi yang sebelumnya digunakan. Jika pengeringan tersebut kurang sempurna, maka larutan purifikasi seperti alkohol atau etanol dapat menurunkan nilai kemurnian DNA pada saat pengukuran pada spektrofotometer.

Definisi DNA genom ialah DNA yang dimiliki oleh sel dari suatu makhluk hidup (Campbell, 2010), yaitu DNA inti, DNA mitokondria, DNA kloroplas dan DNA plasmid (pada sel bakteri). Masing-masing organisme memiliki ukuran DNA genom yang berbeda-beda. Isolasi DNA genom pada penelitian ini selanjutnya dilakukan uji kualitas yaitu dengan cara divisualisasikan pada gel agarose 1% (Gambar 1.).

Kualitas pita DNA yang dihasilkan melalui uji kualitas (visualisasi) DNA pada Gambar 1. menunjukkan adanya perbedaan. Pita DNA ada yang terlihat lebih terang dan tebal dibandingkan sampel pita DNA lain. Hal ini berkaitan dengan konsentrasi DNA yang diperoleh (Tabel 1.), semakin tinggi konsentrasi yang didapatkan, maka pita yang terbentuk semakin tebal dan terang (Sambrook dan Russel, 2011).

Dari hasil kemurnian dan konsentrasi DNA yang diperoleh pada penelitian ini, metode CTAB efektif untuk digunakan pada isolasi DNA tanaman jeruk. Apabila dibandingkan dengan

metode isolasi menggunakan kit isolasi DNA, maka metode CTAB dapat menekan pengeluaran biaya karena harga lebih rendah. Selanjutnya DNA yang diperoleh dari hasil isolasi dapat digunakan untuk penelitian berikutnya, seperti penelitian identifikasi tanaman dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan penanda marka molekuler.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Isolasi DNA tanaman jeruk dapat dilakukan dengan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Setelah diperoleh hasil isolasi DNA, maka dilakukan uji kuantitas dan uji kualitas untuk mengetahui tingkat konsentrasi dan kemurnian DNA.

### Saran

Teknik isolasi DNA tanaman jeruk dapat dilakukan dengan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Chaireni Martasari (Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO)).

## REFERENSI

- Artati, Diah. 2013. Sensitivitas Gel Red sebagai Pewarna DNA pada Gel Elektroforesis. Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur Vol. 11 No. 1.
- Campbell, N. A. Reece, J. B., Mitchell, L. G., Rahayu, L. 2002. Biologi Edisi 5. Jakarta: Erlangga.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. Jackson, R. B., Wulandari, D. T. 2010. Biologi Jilid 1. Edisi ke 8. Jakarta: Erlangga.
- Chen, C., Bowman, K. D., Choi, Y. A., Dang, P. M., Rao, M. N., Huang, S., Soneji, J. R., McCollum, T. G. and Gmitter Jr., F. G. 2007. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Tree Genetics & Genomes. 1-10.
- Kaidah dan Suprpto. 2003. Penentuan Metode Isolasi DNA Tanaman Salak Komersial. Bulletin Penelitian. Vol. 7:55-56.
- Karsinah, Sudarsono, Setyobudi, L., dan Aswidinnoor, H. 2002. Keragaman genetic plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. J. Bioteknologi Pertanian. 7(1):8-16.
- Kunitake, H., Nagasawa, K., Takami, K. and Komatsu, H. 2002. Molecular and cytogenetic charazterization of triploid somatic hybrids between 'Shogun' Mandarin and grapefruit. Plant Biotech. 19(5):345-352.
- Mader, S. S. 1993. Biology. Iowa: Wm. C. Brown Publishers.
- Milligan, B. G. 1992. Plant DNA Isolation. In M. G. Murray and W. F. Thompson. Molecular Genetic Analysis of Population.
- Nayasilana, I. N., Atmoko, S. S. U., Firman. 2010. Teknik Analisis Non-Invasif Mitokondria DNA (MtDNA) BILOU (*Hylobates klossii*, Miller 1903) Melalui *Polymerase Chain Reaction*. J. Primatologi Ind. 7(1):27-33.
- Ningrum, E. P. 2008. Keragaman Gejala dan Penyebab Penyakit Keriting Kuning Cabai. Yogyakarta: Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.
- Purwantara. 2001. Genetika, Biokimia dan Biologi Molekuler. Bandung: PT Rineka Cipta.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. dan Russell. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sudarsono. 1996. Restriction Fragemen Length Polymorphism (RFLP). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Utami, S. T., Kusharyati, D.F., Pramono, H. 2013. Pemeriksaan Bakteri *Leptospira* pada Sampel Darah Manusia *Suspect* Leptospirosis Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Balaba. 9(2): 74-81.
- Wilkins, T. A. and Smart, L. B. 1996. Isolation of RNA from Plant Tissue. Di dalam: Krieg, P. A. (ed). A Laboratory Guide to RNA. Isolation, Analysis and Synthesis. New York: Wiley-Liss.